

DESCRIPTION DU RÉACTIF

Clone	MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6, TOP2A SWT3D1
Classe d'Ig	IgG ₁
Immunogène	MCM2 et TOP2A humaines recombinantes

1. UTILISATION PRÉVUE

Utilisation diagnostique *in vitro*.

Utiliser dans le cadre d'une coloration automatique sur le Ventana Benchmark[®] XT à l'aide du système de détection iView[™].

Le test immunohistochimique ProEx[™] C est destiné à l'évaluation qualitative de l'induction aberrante de la phase S sur des biopsies tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine. L'interprétation des résultats doit être faite par un professionnel agréé en tenant compte des antécédents du patient et des autres tests diagnostiques.

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les protéines MCM (protéines de maintenance du minichromosome) et topoisomérase II alpha (TOP2A) jouent un rôle régulateur important dans la réplication de l'ADN eucaryote : par exemple, le contournement par les oncoprotéines E6 et E7 du PVH des points de contrôle du cycle cellulaire ce qui se traduit par un cycle d'induction prolongé et aberrant de la phase S. Pendant l'activation transcriptionnelle du cycle cellulaire aberrant, les niveaux des protéines MCM2 et TOP2A augmentent dans les cellules en mitose.

Il a été montré que les protéines MCM2 et TOP2A sont surexprimées dans de nombreux et divers tissus dysplasiques et malins dont les néoplasies cervicales¹⁻⁵. La surexpression de ces protéines dans des cellules morphologiquement anormales, démontrée par un profil de coloration nucléaire modérée à intense après emploi de techniques immunohistochimiques (IHC), est indicative de la présence d'une induction d'une phase S aberrante.

3. RÉACTIFS FOURNIS

Le réactif anticorps ProEx[™] C contient des anticorps monoclonaux de souris anti-MCM2 et anti-TOP2A purifiés à partir d'un surnageant de culture tissulaire et dilués dans une solution saline tamponnée contenant des agents de stabilisation protéiques et de l'azide de sodium à 0,09 %.

4. PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Des coupes d'échantillons tissulaires fixés au formol, inclus en paraffine, sont réalisées, déposées sur des lames de verre et déparaffinées. Les coupes d'échantillons sont prétraitées à l'aide d'un tampon afin d'exposer les sites antigéniques. Des agents de blocages sont ajoutés afin de minimiser le bruit de fond due aux peroxydases endogènes et à la liaison aux protéines non spécifiques. L'échantillon est alors incubé avec le réactif anticorps ProEx[™] C. L'addition d'un système chromogène constitué d'une enzyme liée à un anticorps se traduit par la formation d'un produit chromogène visible localisé au niveau des sites de liaison antigène-anticorps. L'échantillon fait alors l'objet d'une contre-coloration par l'hématoxyline, un agent bleuissant est appliqué sur la lame puis une lamelle est mise en place. Les résultats sont interprétés par un professionnel expérimenté à l'aide d'un microscope optique.

5. MATÉRIELS ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS (pour la procédure Ventana Benchmark[®] XT)

- Tampon de réaction 10X – n° de cat. 950-300 2 litres (Ventana Medical Systems)
- LCS (Lamelle liquide) – n° de cat. 650-010 2 litres (Ventana Medical Systems)
- SSC 10X – n° de cat. 950-110 2 litres (Ventana Medical Systems)
- EZ Prep – n° de cat. 950-102 2 litres (Ventana Medical Systems)
- CC1 (Conditionnement des cellules) – n° de cat. 950-124 2 litres (Ventana Medical Systems)
- Kit de détection iView[™] DAB – n° de cat. 760-091 (Ventana Medical Systems)
- Kit d'amplification (A&B) – n° de cat. 760-080 (Ventana Medical Systems)
- Distributeur Prep Kit avec bouton Prep Kit – n° de cat. 786-3034 (Ventana Medical Systems)
- Hématoxyline – n° de cat. 760-2021 (Ventana Medical Systems)
- Réactif bleuissant – n° de cat. 760-2037 (Ventana Medical Systems)
- Lames de verre (SuperFrost[®] Plus ou équivalent)
- Milieu de montage (Acrytol[®] ou équivalent)
- Horloge (capable de mesurer des durées de 1 à 60 minutes)
- H₂O distillée
- Éthanol 95 %, 100 %

- Lamelles de verre
- Marqueur de laboratoire
- Bonbonne de 20 litres (Nalgene[®] ou équivalent)
- Sécheur de lames
- Panier de lames avec bacs de coloration
- Xylène ou substituts du xylène
- Microscope optique (objectifs 10x, 20x (en option), 40x)

6. PRÉCAUTIONS

6.1. Utilisation diagnostique *in vitro*.

6.2. Les étapes de nettoyage des lames nécessitant du xylène doivent être mises en œuvre sous une hotte aspirante agréée.

6.3. Le réactif anticorps ProEx[™] C contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique extrêmement toxique à l'état pur. Bien que non classé parmi les composés présentant un danger aux concentrations du produit, l'azide de sodium est susceptible de réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour donner des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides métalliques dans les canalisations.

6.4. Le DAB (3,3'-diaminobenzidine) est classé parmi les produits suspectés d'être cancérigènes. Éviter tout contact physique ou exposition prolongée ou répétée. Utiliser sous une hotte aspirante agréée.

6.5. Les échantillons et tous les matériels exposés aux échantillons doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre des infections et éliminés conformément aux précautions en vigueur. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter de mettre en contact les réactifs et les échantillons avec la peau et les muqueuses. Laver à grande eau en cas de contact des réactifs avec des régions sensibles.

6.6. Minimiser la contamination microbienne de réactifs pour éviter les colorations non spécifiques.

6.7. Des durées d'incubation, des températures ou des méthodes autres que celles qui sont spécifiées peuvent conduire à des résultats erronés.

6.8. Ne pas utiliser le réactif anticorps ProEx[™] C au-delà de la date de péremption figurant sur le conditionnement. L'utilisateur doit valider les conditions si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles qui sont spécifiées dans la notice.

6.9. Porter des vêtements de protection appropriés pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Pour plus d'informations, se référer aux Fiches de données de sécurité (MSDS).

7. MODE D'EMPLOI

7.1. Préparation des échantillons

7.1.1. Réaliser des coupes de 4 µm dans le bloc de tissu et placer les coupes sur des lames de verre SuperFrost[®] Plus.

7.1.2. Étiqueter les lames

7.1.3. Placer les lames dans une étuve à circulation d'air pendant 20 minutes. Si les lames sont déjà sèches, déposez-les sur un Histo-Orienter jusqu'à ce que la paraffine fonde.

7.2. Préparation du réactif pour le Ventana Benchmark[®] XT

Remarque : Consulter les instructions du fabricant.

7.2.1. Tampon de réaction 10X

7.2.1.1. Enregistrer un nouveau flacon de tampon de réaction 10X concentré

7.2.1.2. Ajouter un (1) flacon de tampon de réaction 10X concentré à 18 litres d'eau distillée. Bien mélanger.

7.2.1.3. Remplir le flacon n°4 EZ Prep sur le Benchmark[®] XT. Vérifier que le pH est compris entre 6,5 et 7,1.

7.2.2. EZ Prep (10X) – Solution de déparaffinage

7.2.2.1. Enregistrer un nouveau flacon de EZ Prep concentré.

7.2.2.2. Ajouter un (1) flacon de EZ Prep concentré à 18 litres d'eau distillée. Bien mélanger.

7.2.2.3. Remplir le flacon n°1 EZ Prep sur le Benchmark[®] XT. Vérifier que le pH est compris entre 6,90 et 7,2.

7.2.3. SSC (10X)

7.2.3.1. Enregistrer deux (2) flacons de SSC concentré.

7.2.3.2. Ajouter deux (2) flacons de SSC concentré à 16 litres d'eau distillée. Bien mélanger.

7.2.3.3. Remplir le flacon n°3 SSC sur le Benchmark[®] XT. Vérifier que le pH est compris entre 7,1 et 7,5.

7.2.4. Prep Kit remplissable

7.2.4.1. Enregistrer le bouton Prep Kit

7.2.4.2. Remplir le distributeur Prep Kit conformément aux instructions du fabricant.

7.3. Remarques concernant la procédure de coloration

7.3.1. Ce protocole doit être utilisé dans le cadre d'une coloration automatique sur le Ventana Benchmark® XT à l'aide du système de détection iView™.

7.3.2. Ne laisser les lames sécher à aucun moment au cours de la procédure. Les lames qui ont pu sécher pendant la procédure peuvent conduire à un accroissement du bruit de fond.

8. PROTOCOLE DE COLORATION AUTOMATIQUE (pour le Ventana Benchmark® XT)

8.1. Allumer le module de coloration du Ventana Benchmark® XT et lancer le logiciel. Consulter les instructions de fonctionnement fournies par le fabricant du Ventana Benchmark® XT.

8.2. Sélectionner les paramètres du protocole suivants dans le logiciel Benchmark® XT .

8.2.1. Paraffine (sélectionné)

8.2.2. Déparaffinage (sélectionné)

8.2.3. Conditionnement des cellules (sélectionné)

8.2.4. Conditionneur n° 1 (sélectionné)

8.2.5. CC1 léger (sélectionné)

8.2.6. CC1 standard (sélectionné)

8.2.7. CC1 étendu (sélectionné)

8.2.8. Températures d'incubation de l'Ac (sélectionné)

8.2.9. Inc. Ac. 37 °C. (sélectionné)

8.2.10. Anticorps (sélectionné)

8.2.11. Appliquer 1 goutte de [PREP KIT 100] (Anticorps) et incubé pendant (1 heure).

8.2.12. Amplifier (sélectionné)

8.2.13. Colorant de contraste (sélectionné)

8.2.14. Appliquer 1 goutte de [Hématoxyline] (Colorant de contraste), appliquer la lamelle et incubé pendant 8 minutes.

8.2.15. Post colorant de contraste (sélectionné)

8.2.16. Appliquer 1 goutte de [Réactif bleuissant] (Post colorant de contraste), appliquer la lamelle et incubé pendant 4 minutes.

8.3. Enregistrer tous les réactifs utilisés au cours du dosage.

8.4. Déterminer le nombre de lames devant être colorées (y compris les contrôles).

8.5. Sélectionner ou créer les étiquettes de chaque lame en vous assurant que chaque étiquette correspond à un seul protocole de coloration.

8.6. Appliquer l'étiquette appropriée sur chaque lame.

8.7. Charger les lames sur le carrousel.

8.8. Charger les distributeurs de réactifs et monter le plateau des réactifs sur le carrousel.

8.9. Remplir les bonbonnes de réactifs en vrac.

8.10. Vérifier la bonbonne du module d'élimination des déchets et la vider si nécessaire.

8.11. Sélectionner "EXÉCUTER" sur l'écran de l'ordinateur principal du Benchmark® XT avant de commencer la coloration.

8.12. Une fois le cycle terminé, imprimer le résumé du protocole et les rapports d'exécution des colorations.

8.13. Retirer les lames de l'instrument et les rincer dans de l'eau savonneuse pendant 3 à 5 minutes ou jusqu'à ce que le résidu de lamelle liquide ne soit plus visible.

8.14. Déshydrater les lames.

8.14.1. Immerger les lames dans de l'éthanol 95 % pendant 1 minute, ou à 25 reprises.

8.14.2. Immerger les lames dans l'alcool absolu à 4 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune.

8.14.3. Nettoyer avec du xylène, à 3 reprises de 1 minute, ou 25 fois, chacune

8.15. Recouvrir les lames d'une lamelle avec un milieu de montage non aqueux.

9. STABILITÉ

9.1. Quand ils sont conservés à la température recommandée, les flacons de réactifs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

9.2. Une fois ouverts, les réactifs sont stables pendant quatre vingt dix (90) jours s'ils sont conservés à la température recommandée.

10. CONTRÔLE QUALITÉ

10.1. La variabilité des résultats provient souvent de différences de manipulations des échantillons qui s'écartent des procédures de test recommandées. Pour plus d'informations, consulter les directives en matière de contrôle qualité du College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry.

10.2. Chaque cycle de coloration doit comporter un contrôle tissulaire positif afin de vérifier les performances du dosage. Si le contrôle tissulaire positif ne présente pas de coloration positive, les résultats obtenus pour les autres échantillons du test doivent être considérés comme suspects ou invalides.

10.3. Chaque cycle de coloration doit comporter un contrôle tissulaire négatif afin de vérifier la spécificité de l'anticorps primaire et de fournir une indication relative à la coloration de fond. Si le contrôle tissulaire négatif présente une coloration positive, les résultats obtenus pour les autres échantillons du test doivent être considérés comme suspects ou invalides.

10.4. Un réactif de contrôle négatif non spécifique peut également être utilisé à la place de l'anticorps primaire afin d'évaluer la coloration non spécifique ou la coloration de fond.

11. INTERPRÉTATION

Une coloration brune, modérée à intense, dans le noyau des cellules signale la présence d'une induction de la phase S aberrante. Un pathologiste doit évaluer les lames colorées à l'aide d'un microscope optique. L'interprétation des résultats doit être faite par un professionnel agréé en tenant compte des antécédents du patient et des autres tests diagnostiques.

12. LIMITES

12.1. La coloration immunohistochimique exige une formation spécialisée dans le domaine de la sélection et de l'application des réactifs.

12.2. Ce réactif permet de réaliser 50 tests en supposant que l'on applique 100 µl de réactif par lame.

12.3. Un certain nombre de cellules normales peuvent être colorées positivement vis-à-vis de l'induction d'une phase S aberrante.

12.4. La coloration optimale des tissus dépend de la fixation et du traitement de l'échantillon.

12.5. Une coloration non spécifique ou une coloration de fond accrue peuvent survenir en raison, mais se limiter à, des variations de la procédure, d'un rinçage inadéquat entre les étapes du dosage, et/ou d'un traitement inadéquat des échantillons.

13. RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

Problème	Cause possible	Action
Absence de coloration des lames de contrôle positives	Réactifs appliqués dans un ordre incorrect.	Revoir le protocole de coloration.
	Omission d'un réactif.	Recommencer le protocole de coloration.
Faible coloration des lames de contrôle positives	Restauration de l'antigène insuffisante	Vérifier les durées d'incubation et les températures du tampon de restauration de l'antigène/épitope.
	Emploi d'un tampon de restauration de l'antigène incorrect.	Revoir le protocole de coloration.
	Incubation inadéquate de l'anticorps primaire.	Revoir le protocole de coloration.
	L'anticorps primaire a été dilué.	Emploi de l'anticorps primaire conformément aux instructions du fabricant.
Coloration de fond excessive	Rinçage inadéquat entre les étapes du dosage.	Recommencer le protocole de coloration.
	Durées d'incubation excessives avec les réactifs clés.	Revoir le protocole de coloration.
	Lames soumises à un dessèchement pendant le traitement postérieur au dosage.	Recommencer le protocole de coloration.

14. BIBLIOGRAPHIE

1. Kastan M and Bartec J. Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 2004. Vol32:316-323.
2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. Nature, 2004. Vol 432:298-432.
3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. CI Cancer Research, 1999. Vol 5:2121-2132.
4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. Eur. J. Biochem 2003. 270:1089-1101.
5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. J Cell Science 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. GLOSSAIRE DE SYMBOLES



Numéro de catalogue



Utilisation diagnostique *in vitro*.



Consulter les instructions d'emploi



Contenu 7 ml



Attention, consulter le manuel d'accompagnement



Respecter la température d'entreposage



Code de lot



Utiliser avant AAAA-MM-JJ ou AAAA-MM



Fabricant

INFORMATION TECHNIQUE

Aux États-Unis, appeler le service technique TriPath, à frais virés 1 866 874-7284.

TRIPATH-IMAGING



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 USA
(800) 426-2176

Développé avec la technologie de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM

MILLENNIUM et **MILLENNIUM** sont des marques commerciales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 USA
www.millennium.com

TriPath Imaging est une marque commerciale de TriPath Imaging, Inc.
ProEx est un produit et une marque commerciale de TriPath Imaging, Inc.